

参 考 文 献

- [1] 陆选永、曾庆镒, 1984, 生物化学与生物物理进展, 4:2—6.
- [2] 酒井 正春, 1985, 生化学, 57(1). 30—35.
- [3] 丛笑倩, 姚 鑫, 1983, 实验生物学报, 16(1) 93—105.
- [4] Strickland, S. et al., 1978, Cell, 15. 393—403.
- [5] Maniatis, T. 1982, Molecular Cloning, 109—112.
- [6] Saber, A. M. et al. 1983 Proc Natl. Acad. Sci., U. S. A. 80. 4017—4020.
- [7] Brahic, M. et al., 1978 Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A. 75, 6125—6129.
- [8] 高 慧, 1979 避孕药科研参考资料, 120—132.
- [9] 叶秀珍等, 1983 实验生物学报, 16(3), 293—305.
- [10] Buc—Caron, M. —H., et al., 1983 Teratocarcinoma stem Cells. 411—420.

小鼠红白血病细胞被诱导向终末期定向分化的观察

陈子兴 吴伟林 谢文洁
(苏州医学院血液病研究室)

小鼠病毒性红白血病细胞(Murine Erythroleukemia Cell, 以下简称 MEL 细胞)在红系祖细胞分化过程中相当于 CFU-e 阶段^[1]。在体外培养的条件下, MEL 细胞能被一些化学物质诱导而向终末期定向分化^[2], 表现在逐渐丧失无限增殖能力^[3], 并合成和积累血红蛋白^[4]。这种定向分化是一项复杂的多步骤过程^[5]。细胞在诱导剂作用下先发生向终末期的定向, 然后经过有限次数的分裂达到终末期, 这个过程中存在着一定的动力学规律。本文对 MEL 细胞在液体培养基中被诱导后的增殖和分化现象和在半固体培养基上形成集落的过程进行细致的动态的观察和分析, 来研究 MEL 细胞从定向到表达出终末期表现型的规律。

材 料 与 方 法

1. 细胞株: MEL 细胞株 DS 19 由美国纽约 Sloan-Kettering 癌症中心 Marks 博士提供并引入本实验室。该细胞株悬浮培养于含 10% 小牛血清和青、链霉素各 100 单位/毫升的 α -MEM 培养液(美国 GIBCO 产品)中。细胞在 37°C、含 5% 二氧化碳饱和潮湿空气的培养箱内培养, 每三天由 2×10^6 细胞/毫

升稀释到 1×10^5 细胞/毫升定量传代。

2. MEL 细胞向终末期定向分化的检测: MEL 细胞经与诱导剂环己亚甲基二乙酰胺(HMBA, Marks 博士赠与)5 mM 共同培养特定时间后, 转移到不含有 HMBA 的盛有 1 毫升 1.8% 甲基纤维素(Fisher 公司产品, CPS 4000)半固体培养基的培养皿中, 在上述培养箱中 37°C 下培养特定时间后, 以 0.2% 二盐酸联苯胺和 3% 过氧化氢染色 5 分钟, 在倒置显微镜下观察集落的大小和联苯胺反应来确定“定向”细胞的百分比。

3. 细胞集落内细胞组成的分析: 在倒置显微镜下, 用微吸管将已染色的集落吸出滴于玻璃片上, 以盖片压开集落, 在普通光学显微镜下观察和计数单个集落中的细胞数。

实 验 结 果

1. HMBA 诱导 MEL 细胞向终末期分化
为了显示被 HMBA 诱导而向终末期定向分化的细胞逐渐丧失了增殖能力, 1.0×10^5 /毫升的 DS 19 细胞在含有 5 mM HMBA 的培养液中培养 4 天后, 将增殖起来的细胞再稀释到 1.0×10^5 /毫升, 分别在含有 HMBA 和不含有 HMBA 的新鲜培养液中进行第二轮培养。培养

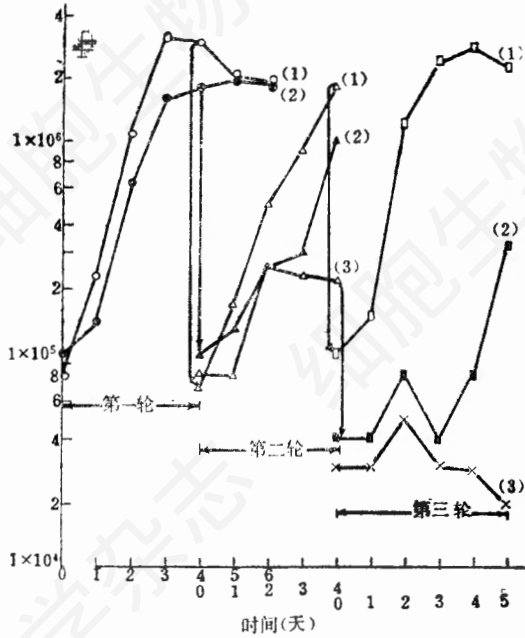


图 1 HMBA 使 DS 19 向终末期定向分化而丧失增殖能力

- (1) DS 19 单独培养
- (2) 稀释后 DS 19 单独培养
- (3) 稀释后与 HMBA 共同培养
- 稀释

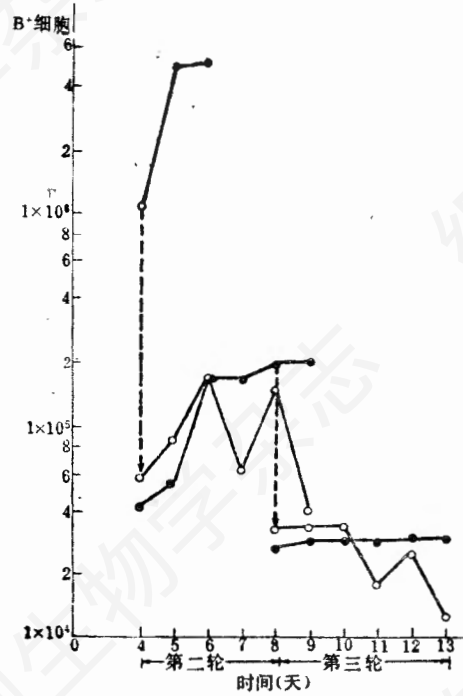


图 3 HMBA 使 DS 19 分化至联苯胺反应阳性的终末期细胞

- DS 19 与 HMBA 共同培养
- DS 19 单独培养
- 稀释

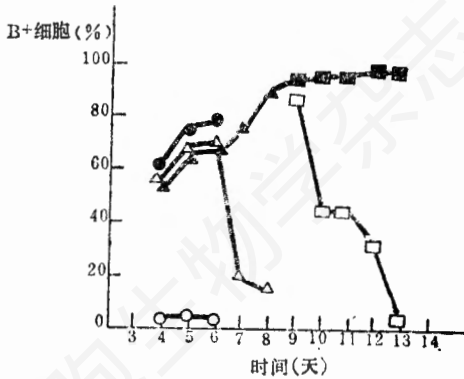


图 2 HMBA 诱导 DS 19 分化至联苯胺反应阳性的终末期细胞

- DS 19 单独培养
- △—△ 第二轮稀释后 DS 19 单独培养
- ▲—▲ 第二轮稀释后 DS 19 与 HMBA 共同培养
- 第三轮稀释后 DS 19 单独培养
- 第三轮稀释后 DS 19 与 HMBA 共同培养
- DS 19 与 HMBA 共同培养

4 天后的细胞如前法稀释和处理再做第三轮培养。对照组细胞也同样每 4 天稀释一次进行三

轮培养。在整个实验过程中的不同时间测定细胞密度和联苯胺反应阳性细胞的百分比。实验结果如图 1 所示。经过每次稀释后,对照组 DS 19 细胞都能在 4 天内由 1.0×10^5 /毫升增殖到 2×10^6 /毫升以上,三条生长曲线基本平行。这说明未经 HMBA 作用的细胞保持着恒定的增殖能力。实验组细胞则不同,第一轮培养的第 4 天虽然也能达到近于 2×10^6 /毫升,但在第二轮培养中,细胞密度经短暂增加后在第 3 天即开始下降,第 4 天时仅为 $2-3 \times 10^5$ /毫升;第三轮培养中,细胞密度即不再增加反而下降。这些现象表明 DS 19 细胞在 HMBA 作用下逐渐减低增殖能力,最后完全丧失了增殖能力而自行死亡。在同一实验中,DS 19 细胞在含有 HMBA 的培养液中培养 4 天后,联苯胺反应阳性的终末期细胞达 60%,随着第 2 轮和第 3 轮稀释并继续在含 HMBA 的培养液中培

养,终末期细胞的百分比不断上升,最后几乎达到100%(图2)。以上结果表明HMBA能诱导MEL细胞定向分化成终末期细胞,使之逐渐丧失增殖能力

2. MEL细胞中“定向”和“未定向”两类细胞的消长。

从图1和图3可见,将上述实验中在含HMBA的培养液中培养过的细胞在第2轮和第3轮传代稀释时转移到不含HMBA的新鲜培养基中,细胞密度在开始3天内只有较慢的增加或没有增加,随后增长速度加快,直至达到与始终在不含HMBA的培养基中生长的细胞相似的增长速度。同时,呈联苯胺反应阳性的终末期细胞百分比则急剧下降。上述实验现象提示在受HMBA作用的MEL细胞总体中形成了“定向”和“未定向”两类细胞。在诱导剂持续作用下,“定向”细胞不断增加并不断达到终末期,使总体中终末期细胞比例不断增加,细胞总数的增长遂逐渐停止。当洗去HMBA时,“定向”细胞仍不断分化到达终末期并随之死亡,“定向”群体不再扩大反而缩小,因此总体中终末期细胞数达到高峰后便逐渐下降。另一方面,“未定向”细胞仍继续增殖,数量增加,使细胞总数又趋回升。由图3可见,这两类细胞的消长交替发生在第2轮稀释后72小时左右。从第48到72小时联苯胺反应阳性细胞数骤降提示在第2轮稀释时已达到终末期的细胞在24—36小时后大批死亡,而在稀释时固定向的细胞在72到96小时后方达到终末期,使联苯胺反应阳性细胞在第4天出现回升。

3. 细胞集落形成和生长的分析

我们在不同时间接种细胞,从特定时间内观察集落形成和生长情况来看细胞的增殖能力。DS19细胞在含有或不含有HMBA的培养液中培养特定时间后,接种于半固体培养基中培养48小时,不经染色分别计数30个各种集落的大小和集落数。因为两组集落形成的时间相同,所以其大小只与细胞的增殖能力有关。表1显示不含HMBA的培养液中的DS19在

培养开始时接种形成的集落内细胞平均数为5—6,到60小时接种,其48小时内形成集落内细胞平均数增加到14—15,即在48小时内,未经HMBA作用的DS19可分裂3到4次。在含HMBA的培养液中,DS19在实验开始时形成集落内的细胞数平均为5,略少于前者,随着接种时间后移,集落内细胞平均数逐渐下降,在60小时接种形成集落的细胞平均数只有2到3个;即在HMBA作用60小时后,细胞的增殖能力大大下降,细胞在接种后的48小时内平均只分裂一次。如果将此时镜下可见的较多单个细胞(这些细胞一次也没分裂)也计入集落数内,则这些细胞在半固体培养基上平均分裂还不到一次。

4. 细胞增殖能力与联苯胺反应性的关系

细胞在联苯胺染色后即死亡而停止增殖,为了同时了解细胞增殖能力和联苯胺反应性的动态变化从而研究两者间的关系,我们采取如下方法:将在不含HMBA的培养液中培养48小时的细胞按相同浓度5000个细胞/毫升接种于一组半固体培养基中,同时将在含HMBA的培养液中培养48小时的细胞同法接种于另一组半固体培养基中。因为每一组内的各个培养皿中细胞,细胞浓度、接种时间和培养条件都相同,所以一组内的各个半固体培养基样本可看成互为复制样本;这样,在不同时间对一组内的一个样本进行染色检测,即可认为是对同一样本在不同时间进行染色检测的动态观察。依此方法在接种后不同时间对这两组半固体培养基复制样本染色观察,每个样本中计数50个集落。结果表明(表2),随着观察时间的推移,未定向细胞形成的联苯胺反应阴性集落不断增大,72小时后阴性集落内细胞平均数为20左右,最高可达300;而定向细胞形成的联苯胺反应阳性集落内细胞平均数仅为3左右,最大阳性集落也只有8个细胞。对接种HMBA作用的细胞的半固体培养基复制样本染色观察时,在较早时间可见许多含1、2或4个细胞

表1 从集落形成过程看定向细胞丧失增殖能力

细胞接种时间 (小时)	培养集落数 细胞	每个集落内的细胞数						平均细胞数/集落 ($\bar{x} \pm SD$)	
		2~	4~	6~	8~	12~	20~		30~
0	DS 19		12	10	8				5.73±1.64
	DS 19 + HMBA	2	10	10	8				5.60±1.85
12	DS 19	2	3	6	16	1	2		7.73±3.92
	DS 19 + HMBA	15	8	6	1				3.53±1.80
24	DS 19		2	15	13				6.73±1.23
	DS 19 + HMBA	13	16	1					3.20±1.13
36	DS 19			12	13	2	3		8.67±4.15
	DS 19 + HMBA	17	9	4					3.13±1.46
48	DS 19		1	1	6	11	10	1	14.00±5.99
	DS 19 + HMBA	16	9	5					3.27±1.53
60	DS 19			1	6	9	13	1	15.07±5.89
	DS 19 + HMBA	20	9	1					2.73±1.11

表2 从对集落的动态观察看细胞增殖潜能与联苯胺反应性的关系

观察时间 (接种后小时)	联苯胺反应性	集落数	每个集落内细胞数						平均细胞数/集落 $\bar{x} \pm SD$
			1	2	3-5	6-10	11-20	20-30	
24	阴性集落		24	20					1.45±0.50
	阳性集落		3	3					1.50±0.55
36	阴性		11	29	2				1.79±0.52
	阳性		2	4	2				2.00±0.76
48	阴性		7	10	9	6			3.47±2.48
	阳性		6	6	6				2.33±1.28
60	阴性			2	10	8	7	2	10.62±8.47
	阳性		5	6	10				2.71±1.31
72	阴性				2	8	13	10	19.15±9.08
	阳性		6	5	5	1			2.59±1.87

表3 混合集落内细胞组成的观察

接种后 观察的 时间	混合集落 百分比(%)	混合集落数 集落内细胞的 联苯胺反应性	每个混合集落中阴性 或阳性细胞数							平均细胞数	阳性/阴性 比 例
			1	2	3	4	5	6	>10		
36	2%	阳性细胞	2							1	1:1
		阴性细胞	2							1	
48	3%	阳性细胞		3						2	1:1
		阴性细胞		3						2	
60	5%	阳性细胞		3	1		1			2.8	1:1.7
		阴性细胞			1	1	1	2		4.8	
72	7%	阳性细胞	2	1	3	1				2.4	1:3.3
		阴性细胞				3	1		3	8.0	

的小集落，它们的联苯胺反应尚非明显阳性，到较晚时间即可见所有这些小集落均呈联苯胺阳性反应，此外未见大的阴性集落，这说明在较早期所见的这些小集落不再增大，且这些集落内的细胞都达到了终末期。

5. 混合型集落的分析

在半固体培养基上形成的有联苯胺反应阴性的大集落、阳性的集落和混合型集落。混合型集落由联苯胺反应阳性和阴性的细胞共同组成，其大小介于阴性大集落和阳性小集落之间。在上述对 HMBA 作用的细胞形成的集落复制样本染色观察中，除了观察各时间的阴性和阳性集落的大小和细胞组成外，还计数了接种后不同时间的混合型集落的数目、大小和细胞组成。实验结果表明，在接种后的 12 小时和 24 小时，大部分均为 1、2 个细胞组成的阴性集落，基本未见混合型集落出现，从接种后 36 小时开始，逐渐出现混合型集落，随着观察时间推迟，混合型集落增加到一定程度后不再增加。在接种后 72 小时观察，混合型集落达到总集落数 7—8%。我们在 36 小时和 48 小时分别观察到 2 个和 3 个混合型集落，集落内的阴性和阳性细胞比例基本相等，如 1:1, 2:2。随着观察时间推移，阴性与阳性细胞比例逐渐增大，如在 60 小时观察到 5 个混合型集落，其中

阳性与阴性细胞比例平均为 1:1.7，72 小时观察到 7 个混合型集落，上述比例平均为 1:3.3。其中阳性细胞最高为 5 个，而阴性细胞最多可达 20 个。这些结果似乎提示在混合型集落里含有达到终末期的已丧失增殖力的细胞，也有尚未达到终末期，还具有有限增殖能力的细胞。

讨 论

目前认为肿瘤细胞的生长符合于细胞模式^[6]，即肿瘤细胞一方面具有自我复制的增殖能力，另一方面又能在某些机理控制下向终末期发生不同程度的分化。研究控制肿瘤向终末期定向分化的机理成为研究肿瘤发生的重要课题之一。MEL 细胞被 HMBA 诱导向终末期分化这一现象为研究这一机理提供了很好的模型系统。本实验工作表明运用这一模型可以在液体悬浮培养的细胞群体中显示细胞丧失增殖能力而变成终末细胞的情况。在半固体培养基上，不但可以根据形成集落的大小来判断细胞的增殖能力，还能从联苯胺反应性来检测集落内细胞的分化情况。所以它比一般的半固体培养基上集落形成的检测(如 CFU-C 检测)更为优越。通过对集落形成过程和集落内细胞组成的仔细观察，我们不仅检测到细胞的终末期分化，而且检测到细胞的“定向”，即细胞在某一事件发

生的时刻虽然还没有表达出终末期的表现型,但从那时起细胞就开始逐步丧失增殖能力,并一定会达到终末期。定向细胞丧失增殖能力和表达出终末期的表现型这两个过程是相关连和一致的。

半固体培养基上的混合型集落的形成似乎颇为费解。因为混合型集落中似乎含有已丧失增殖能力的终末期细胞,又含有未到达终末期的尚具有一定增殖能力的细胞,而已定向的终末细胞是不可逆转的。我们认为有以下两种可能性可以解释混合型集落的形成:一是可能定向细胞在分裂而形成集落的过程中,其子代的分化不均一,某些子代细胞已达到终末期,表现出联苯胺阳性的终末表现型,而另一些子代细胞尚未达到终末期,呈联苯胺阴性反应。第二种可能是细胞在受到诱导剂充分作用后,细胞尚未定向之时被接种于半固体培养基,经过一

次分裂后,一个子代细胞变成了“定向”细胞,再分裂有限次数达到终末期并构成了集落中的联苯胺反应阳性细胞;另一个“未定向”细胞的子代构成集落中的联苯胺反应阴性部分。实验中对混合型集落的观察和分析结果与后一种可能性更为符合。

参 考 文 献

- [1] Marks, P. A. R. A. Rifkind, 1978, *Ann. Res. Biochem.*, 24:419—448.
- [2] Friend, C. et al., 1971, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68:378—382.
- [3] Gusella, J. et al., 1976, *Cell.* 9:221—229.
- [4] Ostertag, W. et al., 1972, *Nature New Biol.*, 239:231—234.
- [5] Chen, Z. X. et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:471—475.
- [6] Buick, R. N., M. N. Pollak., 1984, *Canc. Res.* 44:4909—4918.

胚胎融合制备四亲体小鼠

杨 翰 仪

(白求恩医科大学)

用两个不同基因型小鼠胚胎在其8细胞阶段进行体外胚胎融合。待融合的胚胎发育到囊胚期时,将其移植于另一种假孕雌鼠子宫腔内。约17天后发育成熟分娩得四亲体小鼠(Tetraparental mouse)。这种小鼠各组织和器官都含有两种来源的细胞群体。

四亲体小鼠是由两种纯种小鼠胚胎融合而成。因而是研究胚胎发育、遗传、免疫机制及老年医学等方面有特殊价值的动物模型。本文将介绍胚胎融合制备四亲体小鼠的方法。

材 料 与 方 法^[1,2]

1. 胚胎的收集 C57 BL/6 J(黑毛, H-

2^b)及 A/J(白毛, H-2^b)成年雌鼠,腹腔内注射5 iu 孕马血清(PMS, Organon), 48小时后,注射溶于生理盐水的人绒毛膜促性激素(HCG)5 iu。注射HCG当晚将雌鼠分别与同种雄鼠合笼。次日上午10时前取出雌鼠检查,有白色阴栓者,取出饲养备用。

在发现阴栓两天后,颈椎骨脱位杀死雌鼠,剖腹取出连有输卵管的上半段子官,放入盛有Whitten-Bigger液(以下简称W-B液)的小培养皿中。在解剖镜下,将连接盛有W-B液的注射器的30号针头(针尖磨钝),插入输卵管开口处,以约0.2 ml的W-B液灌洗输卵管及子宫。届时可见子宫切口处有白色混浊液流出。在流